

2K04 トランスポゾンを利用したトランスジェニックカイコの作出と

利用

独立行政法人 農業生物資源研究所 田村俊樹

生命工学材料をカイコに作らせる方法の一つにトランスジェニックカイコを利用する方法がある。トランスジェニックカイコというのは、カイコが本来持っていない遺伝子を遺伝子操作技術により、染色体中に組み込んだ個体のことである。この技術を用いることによって、どの生物の遺伝子でもカイコに組み込み、発現させることができる。たとえば、ヒトのインシュリンやクモのフィブロインをカイコに生産させることも可能である。しかし、植物や哺乳動物とは異なり、カイコを含む昆虫ではこの技術はかなり難しく、ショウジョウバエ以外の昆虫ではトランスジェニック個体を作ることは長い間できなかった。最近になって、昆虫でも機能するトランスポゾンベクターとして用いることにより、ようやくカイコを含むいくつかの昆虫でも成功するようになった (O'Brochta and Atkinson, 1996; Ashburner et al., 1998, 田村, 2000)。このような遺伝子操作技術を実用的に用いる場合、カイコには他の生物にはない利点がある。カイコは自然界では生存できないため、実験の安全性が非常に高いこと、人工飼料による大量飼育技術や生理・生化学的研究、分子遺伝学的研究が進んでいること、大量のタンパク質の生産に適した絹糸腺という特殊な器官を有していること等である。

私達の研究室では、トランスポゾンを利用したトランスジェニックカイコの作出方法を開発した (Tamura et al., 2000)。この方法は比較的簡単で、しかも目的とするカイコの出現率が高く、十分に実用技術といえるレベルに達している。ここではトランスジェニックカイコの作出についての研究の現状と生命工学材料の生産という面から見た可能性について紹介する。

1. トランスジェニックカイコの作出方法

トランスジェニックカイコの作出は図 1 に示した方法で行う。この場合、受精直後のカイコ卵に DNA 溶液を注射する必要がある。カイコ卵は卵殻が固く、通常の方法では DNA を注射できない。そこで、私達の研究室ではマイクロマニピュレーターに接続したタングステン針で卵の一端に穴を空け、この穴にガラスキャピラリーを差し込み、DNA 溶液を空気圧で押し出すことによって注射する方法を用いている。この方で、産卵後 2~4 時間の卵に DNA を注射した場合、半数近くをふ化させることができる。

Construction and utilization of transgenic silkworm using transposon.

Tamura Toshiki, National Institute of Agricultural Resources, Department of Insect Biotechnology and Sericology, Lab. of Gene Engineering, TEL/FAX:0298-38-6091

トランスジェニックカイコを作るためのベクターには DNA 型のトランスポゾンを用いる。カイコで機能する DNA 型のトランスポゾンはゲノムからは見いだされていないため、他の昆虫で研究されているトランスポゾンの中からカイコで機能するものを見出し、これをベクター化した。カイコ以外の昆虫に存在するトランスポゾンがカイコで機能するかどうかは、検定機能を付与したプラスミドを卵に注射し、卵の細胞内でプラスミドからのトランスポゾンの切り出しや転移を見る方法で調べた。その結果、鱗翅目昆虫の由来のトランスポゾン *piggyBac* とショウジョウバエ由来の *Minos* がカイコで機能することが分かった (Tamura, et al., 1998; Shimizu et al., 2000)、このうちの *piggyBac* をベクターとして利用している。

ベクター化したトランスポゾンを利用して行なったトランスジェニックカイコの作出実験の例を表 1 に示した。図 1a に示したようにベクターには緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子をトランスポゾン *piggyBac* に挿入したものをを用いた。また、ヘルパーとして転移酵素を産生し、逆位末端反復配列 (図 1a、矢印の部分) には含まれた領域を染色体に挿入する機能のあるものを一緒に使用した。これらの DNA を卵に注射し、卵から孵化した幼虫を飼育し、次世代においてトランスジェニック体が得られるかどうかを蛍光の有無によって調べた結果、1 回目の実験では、注射した 1058 粒の卵の中から 695 頭がふ化し、424 頭の妊性のある成虫を得ることができた。この成虫同士又は無処理の成虫とを交配することにより 220 区の次世代を得た。これらの区からふ化した幼虫を 1 区ずつシャーレ上に移して人工飼料で飼育し、2 日後に蛍光実体顕微鏡により幼虫の蛍光を観察した。その結果、3 つの区において図 2 に示したような強い蛍光を発する個体が出現した。蛍光を発する幼虫が出現する割合は蛾区によって異なり、表 2 に示したように No5 の蛾区では 167 頭中 12 頭、No79 の蛾区では 157 頭中 15 頭、No101 の蛾区では 156 頭中 41 頭に蛍光が観察された。これらの幼虫を成虫まで飼育し、蛍光を発する個体同士又はホストとして用いた遺伝子が挿入されていない系統と交配した。このようにして次世代を得た後、各成虫から DNA を抽出し、挿入された遺伝子の状態を調べた。その結果、蛍光を強く発している個体は 1 ~ 3 コピーの GFP 遺伝子が染色体中に挿入されており、挿入遺伝子の構造変化はないことが分かった。また、続けて行なった 2 回めの実験においても表 1、2 に示したようにトランスジェニック個体が似た頻度で得られた。最近では生殖細胞の発生予定領域に正確に注射することにより、トランスジェニックカイコができる頻度はさらに高くなり、時には次世代の蛾区の 10% 以上にも達する場合がある。

2. トランスジェニックカイコにおける部位特発的発現

カイコに挿入された遺伝子が次世代へ伝わるかどうかは、得られたトランスジェニックカイコを交配して次世代への挿入遺伝子の伝達様式を見ることによって調べることができる。次世代をサザンによって調べた結果、挿入された遺伝子はゲノム上の位置を動くことなくメンデルの法則に従って次世代へ伝わるということが分かった。また、GFP 遺伝子の発現についても安定しており、少なくとも 4 世代にわたって調べた結果では、変化することはない。

この実験では GFP 遺伝子の発現をカイコの細胞質アクチンのプロモーターで制御している。カイコの細胞質アクチン遺伝子はどの細胞でも発現している、最も組織特異性の低い遺伝子の一つである。興味あることは、細胞質アクチンという組織非特異的な発現を促

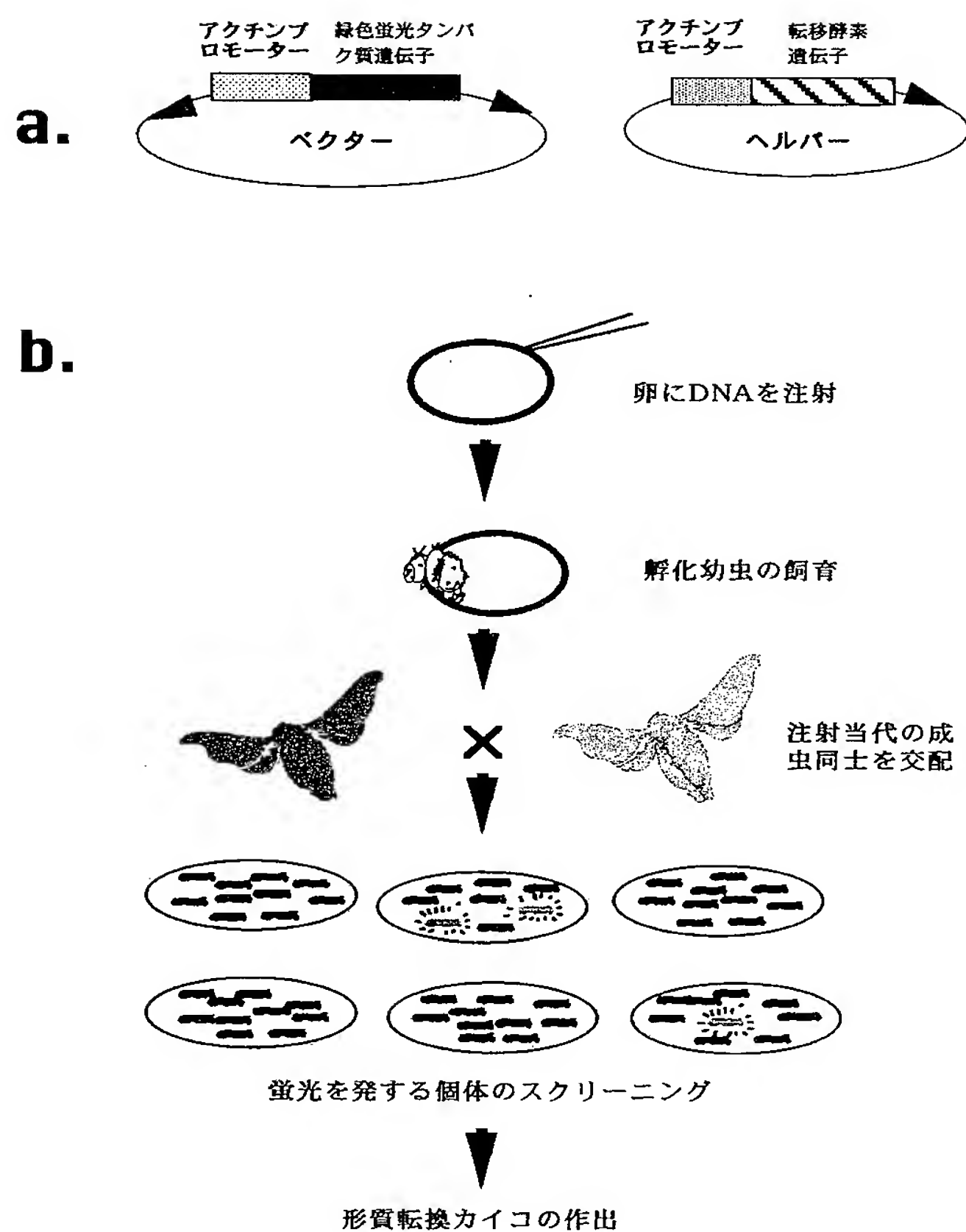


図1 トランスジェニックカイコの作出に用いたベクターの構造 (a) とその作出手順 (b)



図2 得られたトランスジェニックカイコ

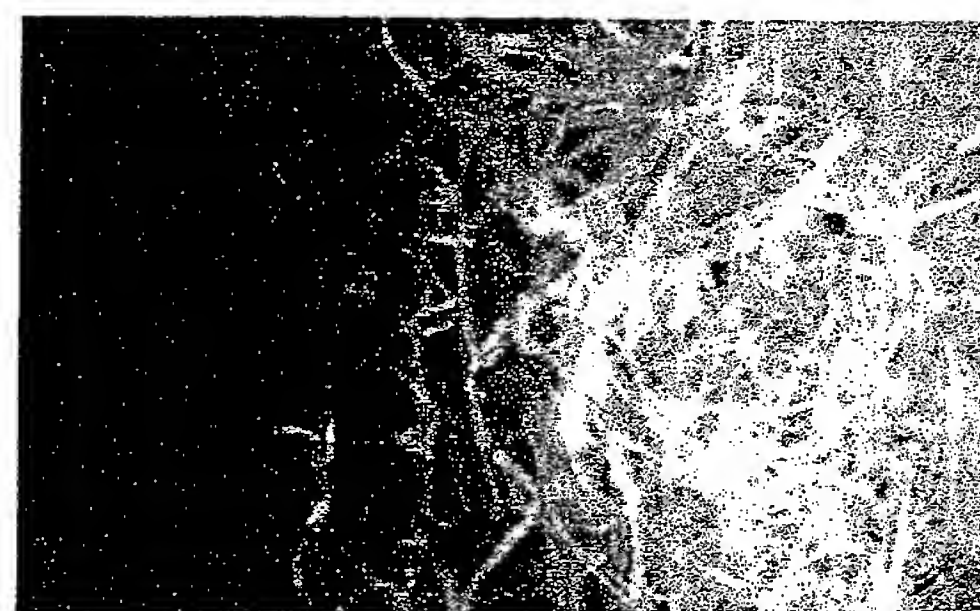


図3 繭糸におけるGFPの発現

表1 カイコ卵へのベクター-DNAの注射

実験区	注射卵数	孵化卵数	成虫数	同胞交配蛾数	戻し交配蛾数	蛍光を発する個体を生じた蛾数 (%)
1	1058	695	424	204	16	3 (1.4)
2	1361	861	506	229	0	2 (0.9)

表2 G1 におけるGFP発現個体の出現率

交配蛾区名	調査個体数	GFP発現個体数 (%)	挿入の生じた数
pnd101	156	41 (26.7)	> 5
pnd79	157	15 (9.6)	> 4
pnd5	167	12 (7.2)	> 6
pnd 8	344	7 (2.0)	ND
pnd92	502	14 (2.8)	ND

すプロモーターであるにも関わらず、得られたトランスジェニックカイコでは絹糸腺においても GFP が大量に作られ、繭糸に分泌されていることである。このことによってトランスジェニックカイコによって異種のタンパク質を大量に絹糸腺で合成し、繭糸中へ分泌することは理論的に可能であることが分かる。

カイコにおいては遺伝子の研究はよく進んでおり、ゲノム研究も進行中である。特に、各組織中で発現している遺伝子は EST データベース (SilkBase) として公開されており、組織特異的に発現している遺伝子を容易に見出すことができる。絹糸腺に限れば、フィブロインH鎖、L鎖、P25、セリシン1と2などの遺伝子は絹糸腺でのみ大量に発現することが分かっている。このような遺伝子のプロモーターを利用することによって、カイコの絹糸腺をバイオリアクターとして生命工学材料の生産に用いることができる。また、この組織の分泌機能は、生産システムとして大変好都合であると予想される。タンパク質の合成系では、精製するのに多くの労力を費やすがこの系では繭に直接目的とするタンパク質を分泌することができる。また、カイコの場合、絹タンパク質を大量に作るために品種改良が重ねられてきた。その結果、現在の品種は1頭当たり0.5gものタンパク質を作る能力があり、幼虫の全窒素の実に70%が繭になるという驚くべき高い生産系である。このような面でも、この系の利用価値は高いものといえよう。

おわりに

DNA 型のトランスポゾンを利用したトランスジェニックカイコの作出技術が確立された。この方法は比較的簡単にトランスジェニック個体を作出できるため、実用的な技術として利用できる。特に、生命工学材料を作るための基盤技術として有効であると考えられる。具体的には、ヒトのホルモンや各種の絹タンパク質の遺伝子を組み込んだカイコを作出し、医薬品や新しい繊維素材を生産するためのバイオリアクターとしての利用が期待される。この技術はまだ開発されたばかりであり、目的に応じたプロモーターの開発や生産された物質の分泌機構など、これから研究が必要な点も多い。しかし、遺伝子の研究が一方で急速に進んでおり、多方面での利用が期待される。

参考文献

- 1) Ashburner et al. (1998) *Insect. Mol. Biol.* 7: 201-213.
- 2) 神田俊男・田村俊樹 (1991) *蚕糸昆虫研報* 3: 31-46.
- 3) O'Brochta, D. A. and Atkinson, P. W. (1996) *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 26: 739-753.
- 4) Shimizu et al. (2000) *Insect Mol. Biol.*, in press.
- 5) Tamura et al. (1998) *Third Intern. Symp. Mol. Insect Sci.*, p129.
- 6) Tamura et al. (2000): *Nature Biotechnology*, 18: 81-84.
- 7) 田村俊樹 (2000) トランスジェニックカイコ：現状と展望. *日蚕雑* 69, 1-12.